

13057006

- 1 -

JAP2005-021045

## 明細書

## 針無注射器を用いた皮膚疾患の遺伝子治療

5 技術分野

本発明は、針無注射器を用いポリヌクレオチドを皮下導入することを特徴とする、皮膚疾患の治療方法に関するものである。

背景技術

10 皮膚疾患は、例えば創傷、皮膚潰瘍、アトピー性皮膚炎、褥創、熱傷、凍瘡、光線過敏症、乾癬、掌蹠膿胞症、湿疹、強皮症など多岐に亘るが、難治性のものが多い。

これらの中でも慢性(難治性)創傷は、具体的には「解剖学的・機能的統合をめざして正しい順序と時期で治癒しない創傷や解剖学的・機能的修復プロセスを経ない創傷」と定義され、いかなる積極的で適当な治療に対しても、その形状、外観における反応がみられず、2-4 週間後にも治癒の傾向がみられない創傷をいい、難治性皮膚疾患の一つである。

また皮膚潰瘍は、持続的な圧迫／摩擦・床ずれや末梢循環障害(血管閉塞性病変など)により血流やリンパ流がうつ滞して組織が虚血状態に陥り、それが持続することによって細胞が壊死することによって起こる、難治性皮膚疾患の一つである。

乾癬には臨床上いくつかの病型があるが、通常は尋常性乾癬が一般的であり、  
1. 表皮の肥厚・角化、2. 表皮／真皮への炎症細胞浸潤を伴う、難治性の慢性炎症性角化疾患の一つである。

25 これらの皮膚疾患に対し、従来は副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、ビタミン A 酸、活性型ビタミン D3、抗ウイルス剤、インターフェロン、プロスタグランデ

BEST AVAILABLE COPY

インなどの薬剤が治療に用いられてきたが、有効性、安全性、再発予防などの観点から満足できる薬剤はなかった。

なお、US 2002/064876号公報および特表2003-502350号公報は参考として本明細書に組み入れられる。

5

### 発明の開示

本発明において解決しようとする問題点は、皮膚疾患、特に難治性皮膚疾患に対し、臨床上有用性の高い治療方法がなかったことである。

本発明は、具体的には下記の皮膚疾患の治療方法である。

10 (1) 針無注射器を用いポリヌクレオチドを皮下導入することを特徴とする皮膚疾患の治療方法。

(2) 針無注射器を用い、皮膚疾患周囲にポリヌクレオチドを噴射／皮下導入することを特徴とする皮膚疾患の治療方法。

(3) ポリヌクレオチドが、DNA、オリゴヌクレオチド、RNA、siRNA、アンチセンスから選ばれた一種である、(1)～(2)記載の治療方法。

15 (4) 1回あたり  $10\text{ }\mu\text{g}\sim10\text{mg}$  のポリヌクレオチドを、皮膚疾患周囲の複数箇所に分割して噴射／皮下導入することを特徴とする、(1)～(3)記載の治療方法。

(5) 針無注射器が、ガス圧または弾性部材の弾力によりピストンを移動させ薬液を噴射することを特徴とする、(1)～(4)記載の治療方法。

20 (6) ガスがヘリウム、窒素または空気であり、弾性部材がバネである、(5)記載の治療方法。

(7) ポリヌクレオチドが、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子である、(1)～(6)記載の治療方法。

(8) オリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号1または2に示される配列を含む

25 NF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチドである、(1)～(7)記載の治療方法。

(9) 皮膚疾患が創傷、皮膚潰瘍または乾癬である、(1)～(8)記載の治療方法。

(10) 創傷が、術後創傷またはけが・事故に基づく創傷である、(1)～(9)記載の治療方法。

(11) 皮膚潰瘍が難治性皮膚潰瘍である、(1)～(10)記載の治療方法。

(12) 難治性皮膚潰瘍が糖尿病性潰瘍、褥瘍(圧迫性潰瘍)、静脈不全に伴う潰瘍または動脈不全に伴う潰瘍である、(1)～(11)記載の治療方法。

(13) 針無注射器を用い、疾患周囲に肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子を噴射／皮下導入することを特徴とする創傷、皮膚潰瘍の治療方法。

(14) 針無注射器を用い、疾患周囲に肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子およびプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子を噴射／皮下導入することを特徴とする、(13)記載の治療方法。

(15) 針無注射器を用い、疾患周囲にNF- $\kappa$ Bデコイオリゴヌクレオチドを噴射／皮下導入することを特徴とする乾癬の治療方法。

(16) 針無注射器を用い皮下導入するための、ポリヌクレオチドを有効成分とする皮膚疾患の治療・改善・予防剤。

(17) 針無注射器を用い、皮膚疾患周囲に噴射／皮下導入するための、ポリヌクレオチドを有効成分とする皮膚疾患の治療・改善・予防剤。

(18) ポリヌクレオチドが、DNA、オリゴヌクレオチド、RNA、siRNA、アンチセンスから選ばれた一種である、(16)または(17)記載の治療・改善・予防剤。

(19) 皮膚疾患周囲の複数箇所に分割して噴射／皮下導入するための、1回あたり  $10\mu\text{g} \sim 10\text{mg}$  のポリヌクレオチドを有効成分とする、(16)ないし(18)記載の治療・改善・予防剤。

(20) 針無注射器が、ガス圧または弾性部材の弾力によりピストンを移動させ薬液を噴射することを特徴とする、(16)ないし(19)記載の治療・改善・予防剤。

(21) ガスがヘリウム、窒素または空気であり、弾性部材がバネである、(20)記

載の治療・改善・予防剤。

(22) ポリヌクレオチドが、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子である、(16)ないし(21)記載の治療・改善・予防剤。

5 (23) オリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号1または2に示される配列を含むNF- $\kappa$ Bデコイオリゴヌクレオチドである、(16)ないし(22)記載の治療・改善・予防剤。

(24) 皮膚疾患が創傷、皮膚潰瘍または乾癬である、(16)ないし(23)記載の治療・改善・予防剤。

10 (25) 創傷が、術後創傷またはけが・事故に基づく創傷である、(16)ないし(24)記載の治療・改善・予防剤。

(26) 皮膚潰瘍が難治性皮膚潰瘍である、(16)ないし(25)記載の治療・改善・予防剤。

15 (27) 難治性皮膚潰瘍が糖尿病性潰瘍、褥瘡(圧迫性潰瘍)、静脈不全に伴う潰瘍または動脈不全に伴う潰瘍である、(16)ないし(26)記載の治療・改善・予防剤。

(28) 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入するための、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子を有効成分とする、創傷、皮膚潰瘍の治療・改善・予防剤。

20 (29) 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入するための、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子およびプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子を有効成分とする、(28)記載の治療・改善・予防剤。

(30) 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入するための、NF- $\kappa$ Bデコイオリゴヌクレオチドを有効成分とする、乾癬の治療・改善・予防剤。

25 (31) 針無注射器を用い皮下導入する皮膚疾患の治療・改善・予防剤を製造するためのポリヌクレオチドの使用。

(32) 針無注射器を用い、皮膚疾患周囲に噴射／皮下導入する皮膚疾患の治療・改善・予防剤を製造するためのポリヌクレオチドの使用。

(33) ポリヌクレオチドが、DNA、オリゴヌクレオチド、RNA、siRNA、アンチセンスから選ばれた一種である、(31)または(32)記載の使用。

5 (34) 1回あたり  $10\mu\text{g}$ ~ $10\text{mg}$  のポリヌクレオチドを、皮膚疾患周囲の複数箇所に分割して噴射／皮下導入することを特徴とする、(31)ないし(33)記載の使用。

(35) 針無注射器が、ガス圧または弾性部材の弾力によりピストンを移動させ薬液を噴射することを特徴とする、(31)ないし(34)記載の使用。

10 (36) ガスがヘリウム、窒素または空気であり、弾性部材がバネである、(35)記載の使用。

(37) ポリヌクレオチドが、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子である、(31)ないし(36)記載の使用。

(38) オリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号1または2に示される配列を含

15 む  $\text{NF}-\kappa\text{B}$  デコイオリゴヌクレオチドである、(31)ないし(37)記載の使用。

(39) 皮膚疾患が創傷、皮膚潰瘍または乾癬である、(31)ないし(38)記載の使用。

(40) 創傷が、術後創傷またはけが・事故に基づく創傷である、(31)ないし(39)記載の使用。

(41) 皮膚潰瘍が難治性皮膚潰瘍である、(31)ないし(40)記載の使用。

20 (42) 難治性皮膚潰瘍が糖尿病性潰瘍、褥瘍(圧迫性潰瘍)、静脈不全に伴う潰瘍または動脈不全に伴う潰瘍である、(31)ないし(41)記載の使用。

(43) 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入する創傷、皮膚潰瘍の治療・改善・予防剤を製造するための、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子の使用。

25 (44) 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入する治療・改善・予防剤を製造するための、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子およびプロスタサイクリ

ン合成酵素(PGIS)遺伝子の(43)記載の使用。

(45) 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入する乾癬の治療・改善・予防剤を製造するための、NF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチドの使用。

ここで本発明における針無注射器とは、注射針を用いずに、ガス圧または弾性部材の弾力によりピストンを移動させて薬液を皮膚に噴射し、薬剤成分を皮下、より好ましくは皮下の細胞内に投与する医療機器を意味する。

具体的には例えば、シマジエット（登録商標）（島津製作所製）、メディ・ジェクター ビジョン(Medi-Jector Vision)（登録商標）(Elitemedical 社製)、ペンジェット(PenJet)（登録商標）(PenJet 社製)などが市販されている。

10 従来の針付注射器と異なり、針無注射器のメリットとしては、疼痛や感染の危険性を回避できることが挙げられる。

次に本発明におけるポリヌクレオチドとは、具体的には例えば、DNA、オリゴヌクレオチド、RNA、siRNA、アンチセンスを挙げることができる。

15 ここでこれらのポリヌクレオチドは裸のままでもよいし、各種ベクターあるいはプラスミドに構成されていてもよい。

本発明におけるポリヌクレオチドは限定されず、公知のものはいずれも対象となり得るが、好適例としては例えば、血管新生因子の遺伝子、プロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子、一酸化窒素合成酵素(NOs)遺伝子、転写因子のデコイオリゴヌクレオチド等を挙げることができる。

20 血管新生因子の遺伝子としてさらに具体的には、例えば肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)遺伝子、上皮細胞増殖因子(EGF)遺伝子、線維芽細胞増殖因子(FGF)遺伝子等を挙げることができ、中でも肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子がより好ましい。肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子の配列は、具体的には例えば特許第2577091号に開示されている。

25 プロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子とは、プロスタグランジン H2 (PGH2)からプロスタグランジン I2 (PGI2)を生成する過程に関わる酵素の遺伝子であ

り、具体的配列は例えば、特再表 95/030013 号に開示されている。

転写因子のデコイオリゴヌクレオチドとしてさらに具体的には、例えば NF- $\kappa$  B デコイオリゴヌクレオチド、E2F デコイオリゴヌクレオチド、AP-1 デコイオリゴヌクレオチド、Ets デコイオリゴヌクレオチド、STAT-1 デコイオリゴヌクレオチド、STAT-6 デコイオリゴヌクレオチド、GATA-3 デコイオリゴヌクレオチド等を挙げることができ、中でも NF- $\kappa$  B デコイオリゴヌクレオチドがより好ましい。

NF- $\kappa$  B デコイオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば GGGRA(C, T)TYYA (C, T)C を含む配列 (R はプリン塩基、Y はピリミジン塩基を意味する) を挙げることができ、さらに具体的には、例えば配列表の配列番号 1 または 2 に示される配列を含むオリゴヌクレオチドを挙げることができる。

また本発明における皮膚疾患も限定されないが、特に難治性皮膚疾患が好適であり、具体的には例えば、創傷、皮膚潰瘍、乾癬を挙げることができる。

創傷も限定されないが、さらに具体的には術後創傷、けが・事故に基づく創傷を挙げることができる。

皮膚潰瘍も限定されないが、より好ましくは難治性皮膚潰瘍であり、さらに好ましくは糖尿病性潰瘍、褥瘡(圧迫性潰瘍)、静脈不全に伴う潰瘍または動脈不全に伴う潰瘍を挙げることができる。

ここで本発明における最も好ましい実施形態としては、以下の組み合わせを挙げることができる。

- 20 1) 針無注射器を用い、疾患周囲の複数箇所に、肝実質細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子を噴射／皮下導入することを特徴とする創傷、皮膚潰瘍の治療方法。
- 2) 針無注射器を用い、疾患周囲の複数箇所に、プロスタサイクリン合成酵素 (PGIS) 遺伝子を噴射／皮下導入することを特徴とする創傷、皮膚潰瘍の治療方法。
- 25 3) 針無注射器を用い、疾患周囲の複数箇所に、肝実質細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子およびプロスタサイクリン合成酵素 (PGIS) 遺伝子を噴射／皮下導入することを特徴とする創傷、皮膚潰瘍の治療方法。

4) 針無注射器を用い、疾患周囲の複数箇所に、NF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチドを噴射／皮下導入することを特徴とする乾癬の治療方法。

本発明におけるポリヌクレオチドの投与量も、疾患の種類・程度・発現部位・面積、患者の年齢、性別、合併症、併用薬等によって異なり限定されないが、通常1回あたり  $10\mu\text{g} \sim 10\text{mg}$  のポリヌクレオチドを、皮膚疾患周囲の複数箇所に分割して噴射／皮下導入することが好ましい。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 10 図面の簡単な説明

図1は、Yellow Fluorescence Protein (Venus) の発現は表皮組織のみに認められたことを示す写真である。

図2は、LacZ の発現は表皮組織のみに認められたことを示す写真である。

図3は、シマジエット噴射群で注射群に較べて約100倍のルシフェラーゼ活性を示し、高い導入効率が得られたことを示した図である。

図4は、4、6日目にて HGF、PGIS 噴射群にて創傷治癒促進効果を認めた図である。また同時噴射群 (Group5) では効果の増強を認めたことを示す図である。

図5は、HGF、PGIS とも創周囲血流の増強効果を認めたことを示す写真である。

図6は、HGF、PGIS とも創部表皮組織にその遺伝子発現を認めたことを示す写真である。

図7は、HGF 蛋白質の上昇を認めたことを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がこれらに限定されることは言うまでもない。

##### [実施例1]

導入部位の確認

Yellow Fluorescence Protein (Venus) プラスミド (Venus/pCS2) ラット皮膚噴射による導入部位の確認。(図 1 参照)

方法 : (1) ラット背部皮膚剃毛後、カネボウ epilat 除毛クリームで除毛後シマジ

5 ェットにて Yellow Fluorescence Protein (Venus)/pCS2 100  $\mu$ g/100  $\mu$ l 噴射した。比較のため、対照には Venus を含まないプラスミド (pCS2) を用いた。

(2) 24 時間後にラットを犠牲死させ、打ち込み部位の皮膚を採取した。

(3) OCT compound に組織を入れ液体窒素で急速凍結した後、切片を作製し蛍光顕微鏡で観察した。

10 結果 : Yellow Fluorescence Protein (Venus) の発現は表皮組織のみに認められた。

lacZ プラスミド (pcLacZ) ラット皮膚噴射による導入部位の確認。(図 2 参照)

方法 : (1) ラット背部皮膚剃毛、除毛後シマジエットにて pcLacZ 200  $\mu$ g/200  $\mu$ l 噴射した。

15 (2) 24 時間後にラットを犠牲死させ、打ち込み部位の皮膚を採取した。

(3) OCT compound に組織を入れ液体窒素で急速凍結した後、切片を作製した。切片を 1% グルタールアルデヒドで固定し、 $\beta$ -gal 染色液で染色し、顕微鏡で観察した。

結果 : LacZ の発現は表皮組織のみに認められた。

20 [実施例 2]

導入効率の評価

ルシフェラーゼ活性測定 (図 3 参照)

方法 : (1) ラット背部皮膚剃毛、除毛後、それぞれ 50  $\mu$ g/50  $\mu$ l および 100  $\mu$ g/100  $\mu$ l のルシフェラーゼプラスミド (pGL3 luc) をラット皮膚にシマジエットで

25 噴射した。

比較するために同量のプラスミドをラット皮内に 26G 注射器で注入した。

(2) 24 時間後にラットを犠牲死させ、打ち込み部を中心に約 2cm 四方の皮膚を採取した。コントロールとして無処置のラット皮膚も採取した。

(3) Luciferase lysis buffer (Promega) を 1ml 加えてハサミでできるだけ細かくカットした。

5 (4) -80°C 10 分で急速冷凍し、その後室温で解凍した。これを 2 回繰り返した。

(5) 5000rpm、10 分遠心し、上清を採取した。

(6) ルシフェラーゼ活性を測定した。(Berthold LB9507)

図 3 に各処置における総ルシフェラーゼ活性を表示した。なお、図 3 において、

「皮注 50」、「皮注 100」は、それぞれ 50 μg/50 μl、100 μg/100 μl の pGL3 luc

10 プラスミドをラット皮内に注入したことを示し、「シマ 50」、「シマ 100」は、それぞれ 50 μg/50 μl、100 μg/100 μl の pGL3 luc プラスミドをラット皮膚にシマジエットで噴射したことを示す。

結果：シマジエット噴射群で注射群に較べて約 100 倍のルシフェラーゼ活性を示し高い導入効率を確認した。

15 [実施例 3]

#### 創傷治癒効果の検討

##### ラット創傷治癒障害モデルの作製

ラット創傷治癒傷害モデルの作製には、ステロイドとして水溶性プレドニゾロ

ン (Prednisolone Sodium Succinate : Pz、Shionogi&CO., LTD) を投与したラッ

20 モルを利用した。ステロイド投与ラットモデルは、ステロイドの投与により、創抗張力、上皮化、血管新生、創収縮などの傷害が起こり、その結果、創傷治癒の遅延を生じる。

(1) 7 週オスの Wister ラットに 30mg/kg の水溶性プレドニゾロン (Prednisolone Sodium Succinate、Shionogi&CO., LTD) を筋肉内注射し、3 日後 (創作製当 25 日) に再び 30mg/kg の水溶性プレドニゾロンを筋肉内注射した。コントロール群には PBS を筋肉注射した。

- 11 -

(2) ラット背部皮膚剃毛、除毛後、直径 1.6cm (面積約 2cm<sup>2</sup>) の円形の皮膚を全層切除した創を作製した。

#### プラスミド導入

(3) 創周囲にシマジエットでプラスミド (HGF、PGIS、又は HGF+PGIS) を 5箇所  
5 噴射した。いずれも一種類のプラスミド、1 回の噴射において、100 μg/100 μl  
のプラスミド量、液量を使用した。

コントロールとして PBS を噴射した。(各群 n=6)

HGF プラスミド； CAS 登録 No. [627861-07-8]

PGIS プラスミド； WO95/30013 号公報の配列番号 11 に記載された cDNA を、 pVAX  
10 1 (Invitrogen 社製) に組み込んだ。

	筋肉注射	シマジエット (0 日)	シマジエット (2 日)
Group 1	PBS	PBS	
Group 2	PZ	PBS	
Group 3	PZ	HGF(100 μg × 5)	
Group 4	PZ	PGIS(100 μg × 5)	PGIS(100 μg × 5)
Group 5	PZ	HGF(100 μg × 5) + PGIS(100 μg × 5)	

#### 創面積の計測 (図 4 および下表参照)

(4) 創作製 0, 2, 4, 6, 9, 12 日目に創をトレーシングペーパーでトレースした後、ス  
15 キャナで取り込み NIH image1.61 で面積を計算した。0 日目を 100 とし以後割合  
を計算した。

結果：4、6 日目にて HGF、PGIS 噴射群にて創傷治癒促進効果を認めた。同時噴  
射群 (Group5) では効果の増強を認めた。

- 12 -

		創面積 (%)					
		0	2	4	6	9	12 (日)
Group 1	PBS+PBS	100	102.04	94.04	72.54	41.68	16.72
Group 2	PZ+PBS	100	110.5	99.2	96.85	46.5	23
Group 3	PZ+HGF	100	91.3	88.1	74	38.66	17.5
Group 4	PZ+PGIS×2	100	104.8	86.45	72.6	31.95	13.45
Group 5	PZ+HGF+PGIS	100	96.4	79.725	64.1	46.1	20.1

## 血流測定 (図 5 参照)

(5) 創作製 4 日目にラット背部創周囲の血流の状態を Laser Doppler Imager (Mor) で測定した。

5 結果 : HGF、PGIS とも創周囲血流の増強効果を認めた。

## HGF、PGIS の遺伝子発現の確認 (図 6 参照)

創部の皮膚を採取し、HGF 及び PGIS の免疫染色を以下の手順で行った。

## HGF の免疫染色

採取した皮膚標本をパラフィン固定した後、切片を作製した。切片を 100% キシレン 5 分、3 回、100% アルコール 5 分、2 回、99% アルコール 5 分、90% アルコール 5 分、75% アルコール 5 分で脱パラフィンした後、10 分間水洗した。95°C、15 分間賦活化した。切片を 80% メタノール / 0.6% 過酸化水素と 3% 過酸化水素で処理した後、正常ヤギ血清で 30 分間ブロッキングした。10 倍希釈した一次抗体 (抗ヒト HGFb (H495) ウサギポリクローナル抗体、18134 免疫生物研究所) を加え、4°C で一晩インキュベートした。一次抗体洗浄後、二次抗体 (抗ウサギ抗体、Vectastain Elite ABC kit biotinylated antibody) を加え、室温で 30 分間インキュベートした。二次抗体を洗浄後、Vectastain Elite ABC reagent を加え、30 分間インキュベートした。DAB (フナコシ) で染色した後、ヘマトキシリン・エオシンでカウンター染色した。切片を脱水、封入し、検鏡に供した。

結果：HGF の発現が表皮組織に認められた。

#### PGIS の免疫染色

採取した皮膚標本から凍結切片を作成し、冷凍庫で一晩乾燥させた後、冷アセトン（-20℃）で 15 分間固定した。アビジン、ビオチンをブロックした後、8 5 0%メタノール／0.6%過酸化水素と 3%過酸化水素で処理した。コンプレックス抗体（一次抗体、抗 PGIS C 末端部分ペプチドウサギポリクローナル抗体（1000 倍希釈）と二次抗体、抗ウサギ・ビオチン標識ヤギ抗体（DAKO E0432）（300 倍希釈）及びウサギ正常血清の混合物）を加え、4℃で一晩インキュベートした。抗体洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（DAKO E1016）を室温で 3 10 0 分間反応させ、DAB（フナコシ）で染色後、ヘマトキシリン・エオシンでカウンター染色した。切片を脱水、封入し、検鏡に供した。

結果： PGIS の発現が表皮組織に認められた。

#### [実施例 4]

##### HGF 蛋白質定量（図 7 参照）

15 (1) ラット背部皮膚剃毛、除毛後 HGF プラスミドをシマジエットで噴射 24 時間後にラットを犠牲死させ、組織（約 40mg）を採取した。  
(2) 800 μl の PBS で洗浄後、10 倍量の抽出バッファーを加えてホモジナイズした。  
(抽出バッファー：20mM Tris-HCL buffer (pH7.5) ; 2M NaCl ; 0.1% Tween80 ; 1 mM EDTA ; 1mMPMSF)  
20 (3) 15000rpm、4℃、30 分遠心した。  
(4) 上清を採取し ELISA (Biosource) で測定した。

結果：HGF 蛋白質の上昇を認めた。

#### 産業上の利用の可能性

25 本発明の実施により、従来臨床上有用性の高い治療方法がなかった皮膚疾患、特に難治性皮膚疾患に対する治療方法が提供される。

## 請求の範囲

1. 針無注射器を用いポリヌクレオチドを皮下導入することを特徴とする皮膚疾患の治療方法。
- 5 2. 針無注射器を用い、皮膚疾患周囲にポリヌクレオチドを噴射／皮下導入することを特徴とする皮膚疾患の治療方法。
3. ポリヌクレオチドが、DNA、オリゴヌクレオチド、RNA、siRNA、アンチセンスから選ばれた一種である、請求項1または2記載の治療方法。
4. 1回あたり $10\mu\text{g}\sim10\text{mg}$ のポリヌクレオチドを、皮膚疾患周囲の複数箇所10に分割して噴射／皮下導入することを特徴とする、請求項1ないし3のいずれか一項記載の治療方法。
5. 針無注射器が、ガス圧または弾性部材の弾力によりピストンを移動させ薬液を噴射することを特徴とする、請求項1ないし4のいずれか一項記載の治療方法。
- 15 6. ガスがヘリウム、窒素または空気であり、弾性部材がバネである、請求項5記載の治療方法。
7. ポリヌクレオチドが、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子である、請求項1ないし6のいずれか一項記載の治療方法。
- 20 8. オリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号1または2に示される配列を含むNF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチドである、請求項1ないし7のいずれか一項記載の治療方法。
9. 皮膚疾患が創傷、皮膚潰瘍または乾癬である、請求項1ないし8のいずれか一項記載の治療方法。
- 25 10. 創傷が、術後創傷またはけが・事故に基づく創傷である、請求項1ないし9のいずれか一項記載の治療方法。

11. 皮膚潰瘍が難治性皮膚潰瘍である、請求項1ないし10のいずれか一項記載の治療方法。
12. 難治性皮膚潰瘍が糖尿病性潰瘍、褥瘡(圧迫性潰瘍)、静脈不全に伴う潰瘍または動脈不全に伴う潰瘍である、請求項1ないし11のいずれか一項記載の治療方法。  
5
13. 針無注射器を用い、疾患周囲に肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子を噴射／皮下導入することを特徴とする創傷、皮膚潰瘍の治療方法。
14. 針無注射器を用い、疾患周囲に肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および  
10 プロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子を噴射／皮下導入することを特徴とする、請求項13記載の治療方法。
15. 針無注射器を用い、疾患周囲に NF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチドを噴射／皮下導入することを特徴とする乾癬の治療方法。
16. 針無注射器を用い皮下導入するための、ポリヌクレオチドを有効成分と  
15 する皮膚疾患の治療・改善・予防剤。
17. 針無注射器を用い、皮膚疾患周囲に噴射／皮下導入するための、ポリヌクレオチドを有効成分とする皮膚疾患の治療・改善・予防剤。
18. ポリヌクレオチドが、DNA、オリゴヌクレオチド、RNA、siRNA、アンチ  
センスから選ばれた一種である、請求項16または17記載の治療・改  
善・予防剤。  
20
19. 皮膚疾患周囲の複数箇所に分割して噴射／皮下導入するための、1回あたり  $10\mu\text{g}$ ～ $10\text{mg}$  のポリヌクレオチドを有効成分とする、請求項16ないし18のいずれか一項記載の治療・改善・予防剤。
20. 針無注射器が、ガス圧または弾性部材の弾力によりピストンを移動させ  
25 薬液を噴射することを特徴とする、請求項16ないし19のいずれか一項記載の治療・改善・予防剤。

21. ガスがヘリウム、窒素または空気であり、弾性部材がバネである、請求項 20 記載の治療・改善・予防剤。

22. ポリヌクレオチドが、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子である、請求項 16 ないし 21 のいずれか一項記載の治療・改善・予防剤。

23. オリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号 1 または 2 に示される配列を含む NF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチドである、請求項 16 ないし 22 のいずれか一項記載の治療・改善・予防剤。

24. 皮膚疾患が創傷、皮膚潰瘍または乾癬である、請求項 16 ないし 23 のいずれか一項記載の治療・改善・予防剤。

25. 創傷が、術後創傷またはけが・事故に基づく創傷である、請求項 16 ないし 24 のいずれか一項記載の治療・改善・予防剤。

26. 皮膚潰瘍が難治性皮膚潰瘍である、請求項 16 ないし 25 のいずれか一項記載の治療・改善・予防剤。

27. 難治性皮膚潰瘍が糖尿病性潰瘍、褥瘍(圧迫性潰瘍)、静脈不全に伴う潰瘍または動脈不全に伴う潰瘍である、請求項 16 ないし 26 のいずれか一項記載の治療・改善・予防剤。

28. 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入するための、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子を有効成分とする、創傷、皮膚潰瘍の治療・改善・予防剤。

29. 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入するための、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子およびプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子を有効成分とする、請求項 28 記載の治療・改善・予防剤。

30. 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入するための、NF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチドを有効成分とする、乾癬の治療・改善・予防剤。

31. 針無注射器を用い皮下導入する皮膚疾患の治療・改善・予防剤を製造す

るためのポリヌクレオチドの使用。

32. 針無注射器を用い、皮膚疾患周囲に噴射／皮下導入する皮膚疾患の治療・改善・予防剤を製造するためのポリヌクレオチドの使用。

33. ポリヌクレオチドが、DNA、オリゴヌクレオチド、RNA、siRNA、アンチ  
5 センスから選ばれた一種である、請求項31または32記載の使用。

34. 1回あたり10 $\mu$ g～10mgのポリヌクレオチドを、皮膚疾患周囲の複数箇所に分割して噴射／皮下導入することを特徴とする、請求項31ないし3  
3のいずれか一項記載の使用。

35. 針無注射器が、ガス圧または弾性部材の弾力によりピストンを移動させ  
10 薬液を噴射することを特徴とする、請求項31ないし34のいずれか一項記載の使用。

36. ガスがヘリウム、窒素または空気であり、弾性部材がバネである、請求項35記載の使用。

37. ポリヌクレオチドが、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／または  
15 プロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子である、請求項31ないし36のいずれか一項記載の使用。

38. オリゴヌクレオチドが、配列表の配列番号1または2に示される配列を含むNF- $\kappa$ Bデコイオリゴヌクレオチドである、請求項31ないし37のいずれか一項記載の使用。

20 39. 皮膚疾患が創傷、皮膚潰瘍または乾癬である、請求項31ないし38のいずれか一項記載の使用。

40. 創傷が、術後創傷またはけが・事故に基づく創傷である、請求項31ないし39のいずれか一項記載の使用。

41. 皮膚潰瘍が難治性皮膚潰瘍である、請求項31ないし40のいずれか一  
25 項記載の使用。

42. 難治性皮膚潰瘍が糖尿病性潰瘍、褥瘡(圧迫性潰瘍)、静脈不全に伴う潰

瘍または動脈不全に伴う潰瘍である、請求項 3 1 ないし 4 1 のいずれか一項記載の使用。

4 3. 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入する創傷、皮膚潰瘍の治療・改善・予防剤を製造するための、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子および／またはプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子の使用。

4 4. 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入する治療・改善・予防剤を製造するための、肝実質細胞増殖因子(HGF)遺伝子およびプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子の請求項 4 3 記載の使用。

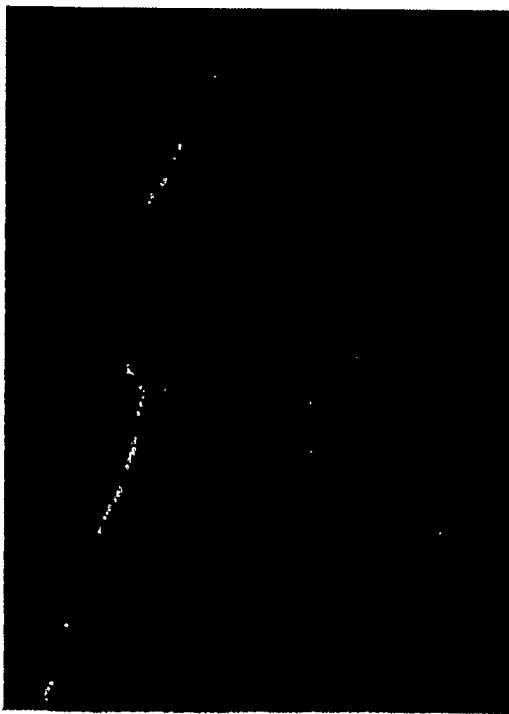
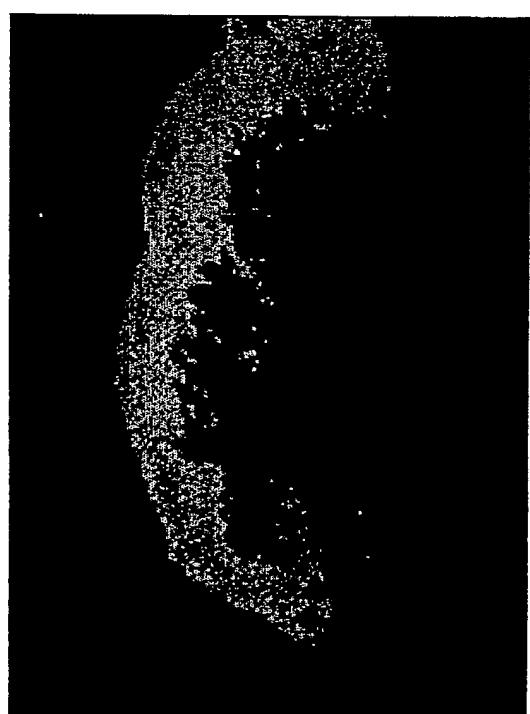
4 5. 針無注射器を用い、疾患周囲に噴射／皮下導入する乾癬の治療・改善・予防剤を製造するための、NF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチドの使用。

1 / 7

図 1

 $\times 40$  $\times 200$ 

対照

 $\times 40$  $\times 200$ 

Venus

2 / 7

図 2

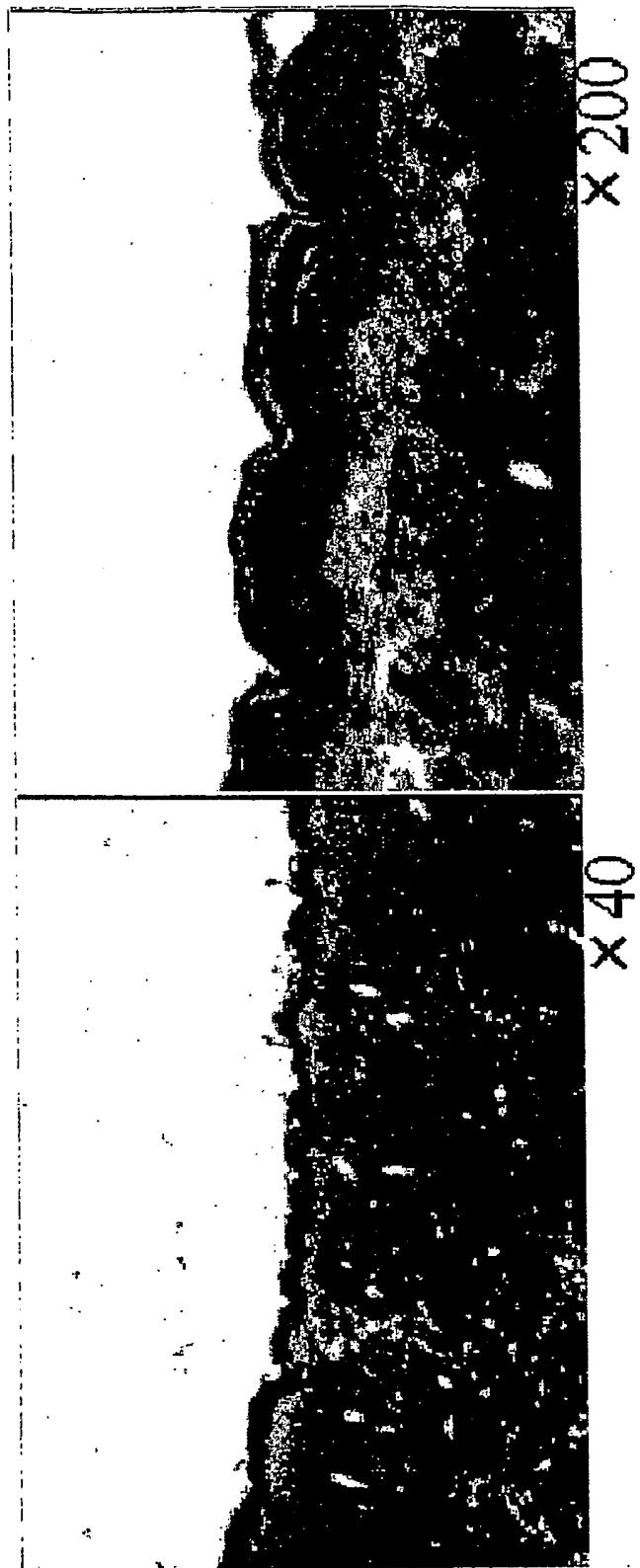
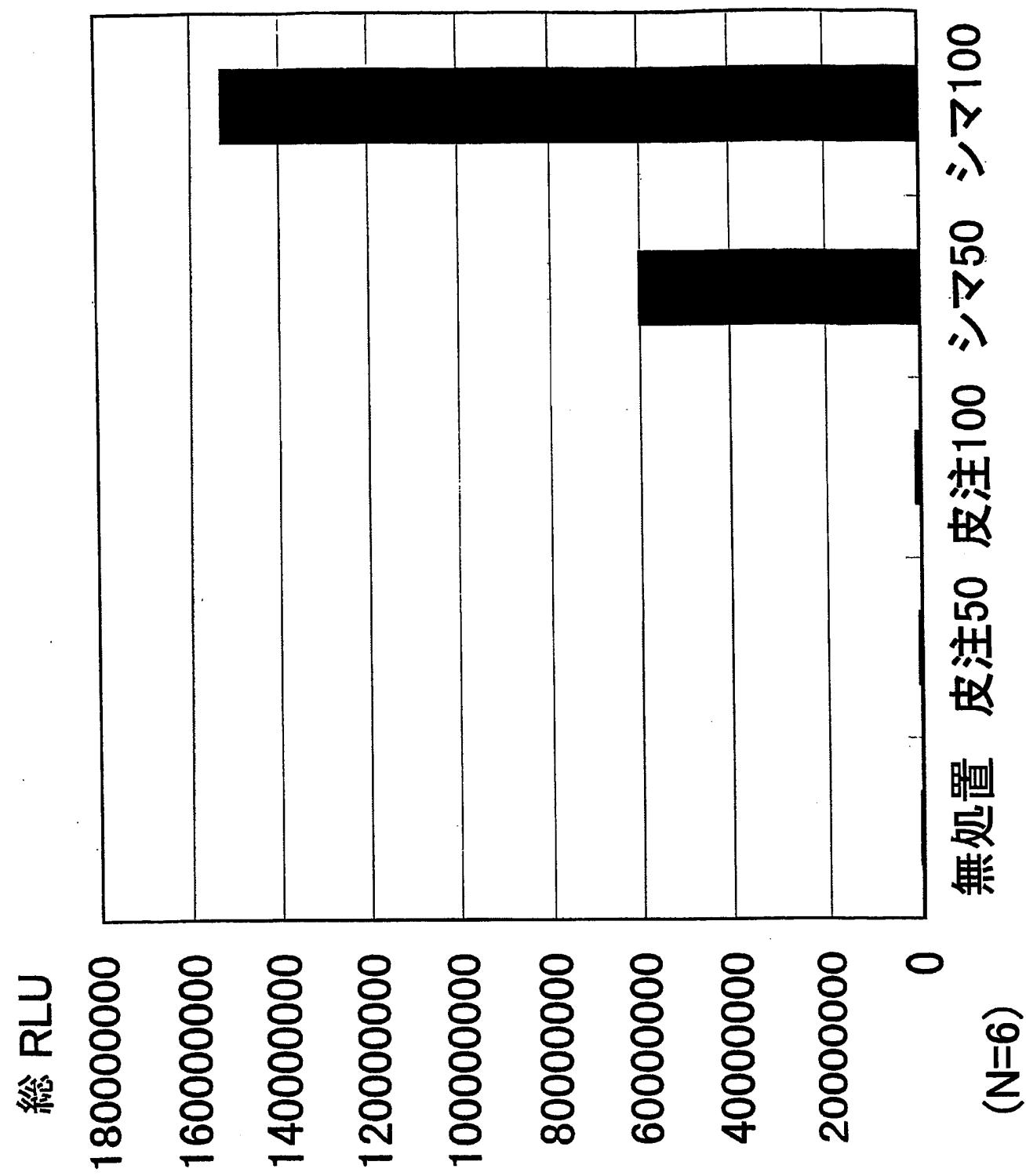


図 3



4 / 7

図4

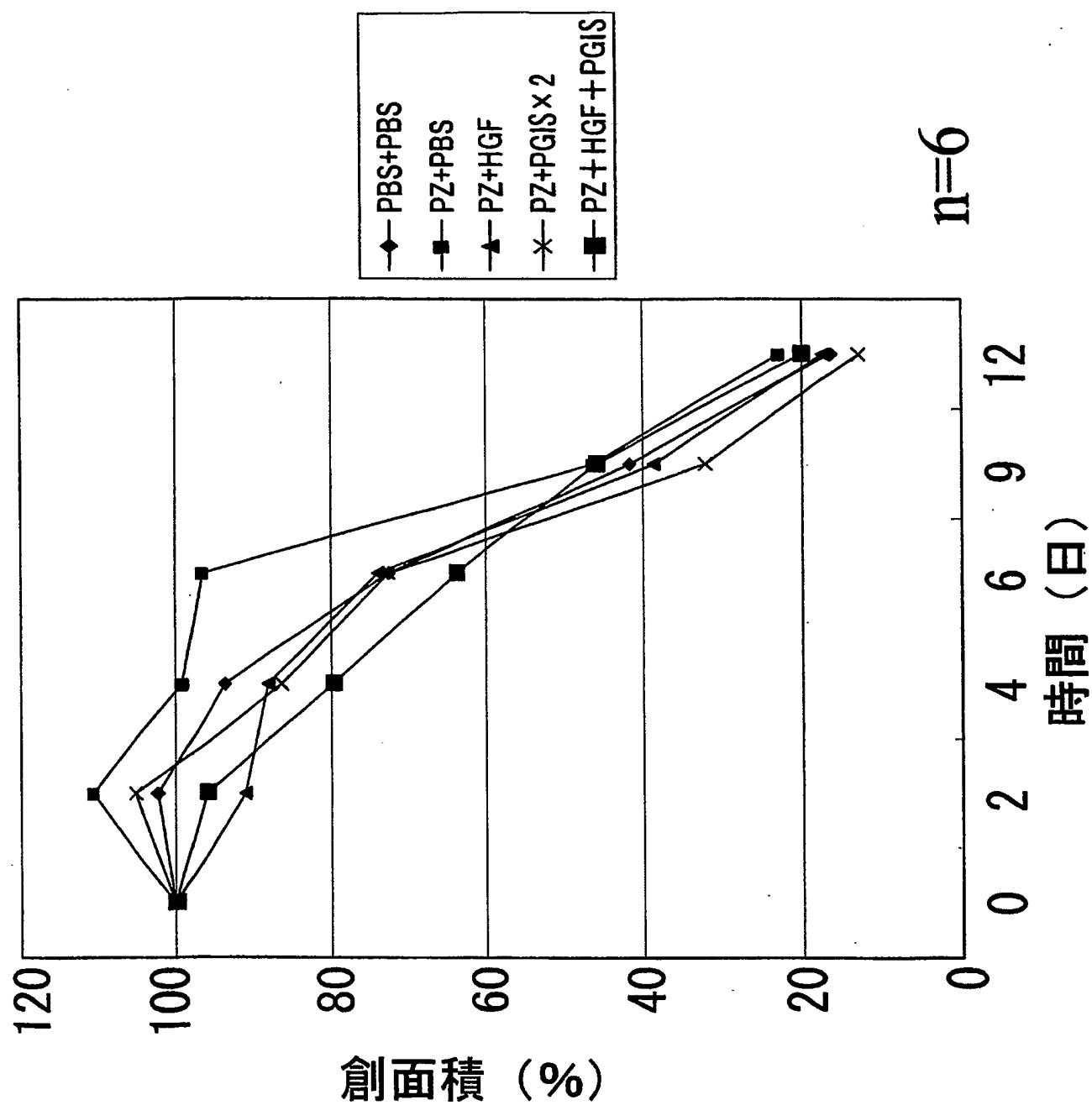
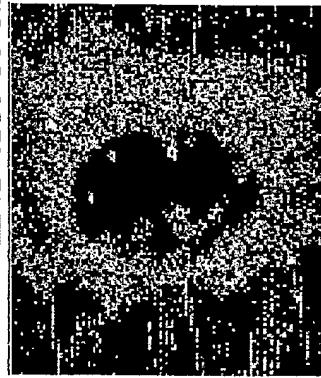


図 5

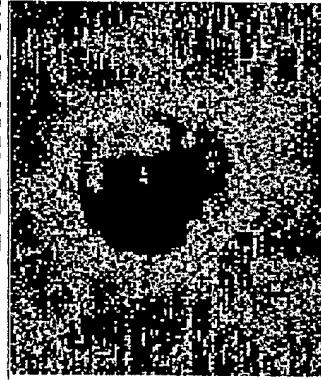
LDI( 4日 )

PBS 筋肉内注射



PBS

PZ 筋肉内注射



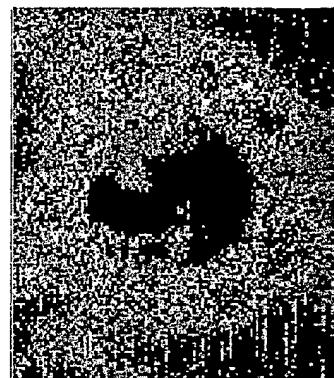
PBS

PZ 筋肉内注射



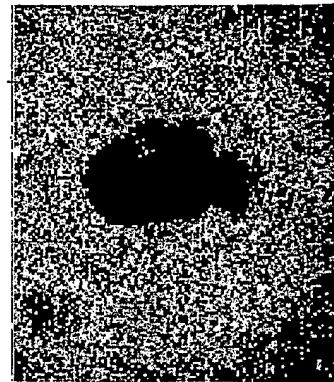
HGF

PZ 筋肉内注射



PGIS × 2

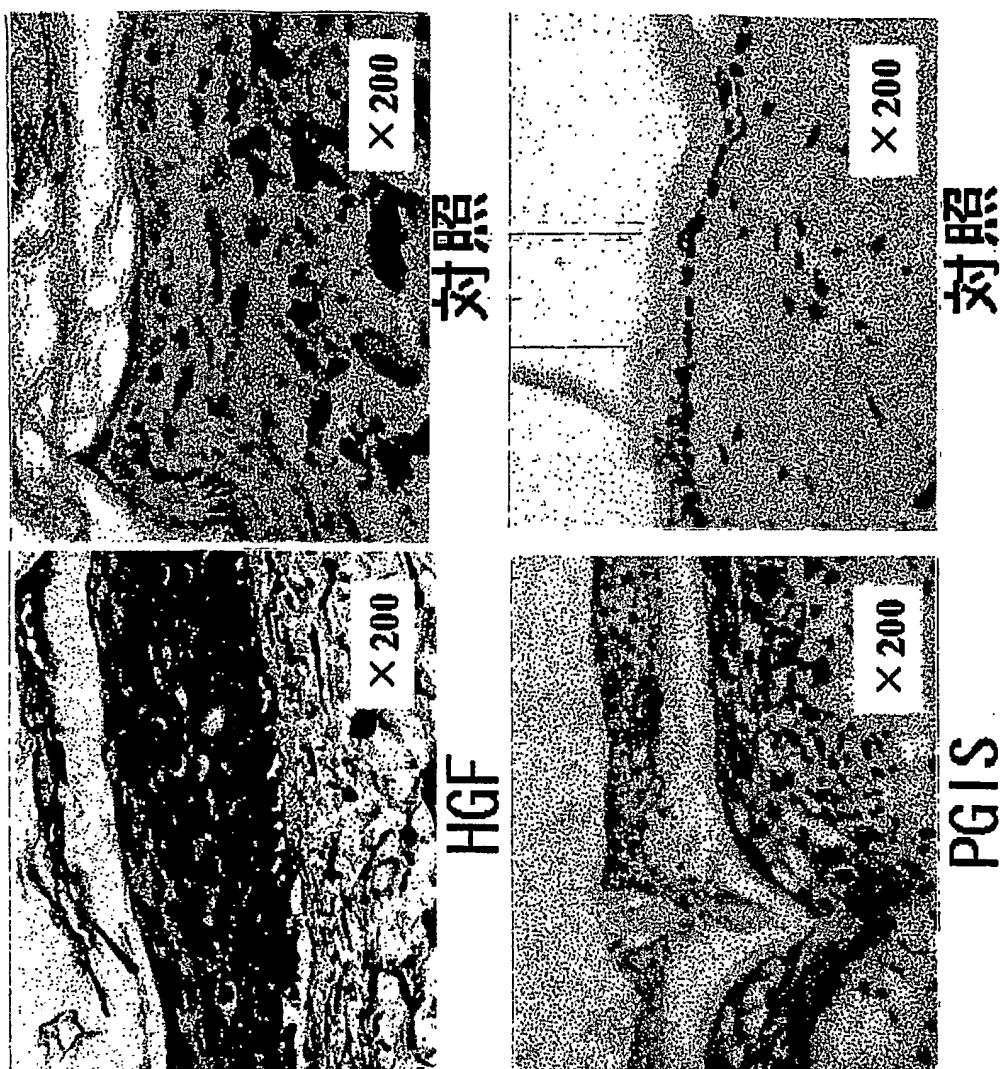
PZ 筋肉内注射



HGF + PGIS

6 / 7

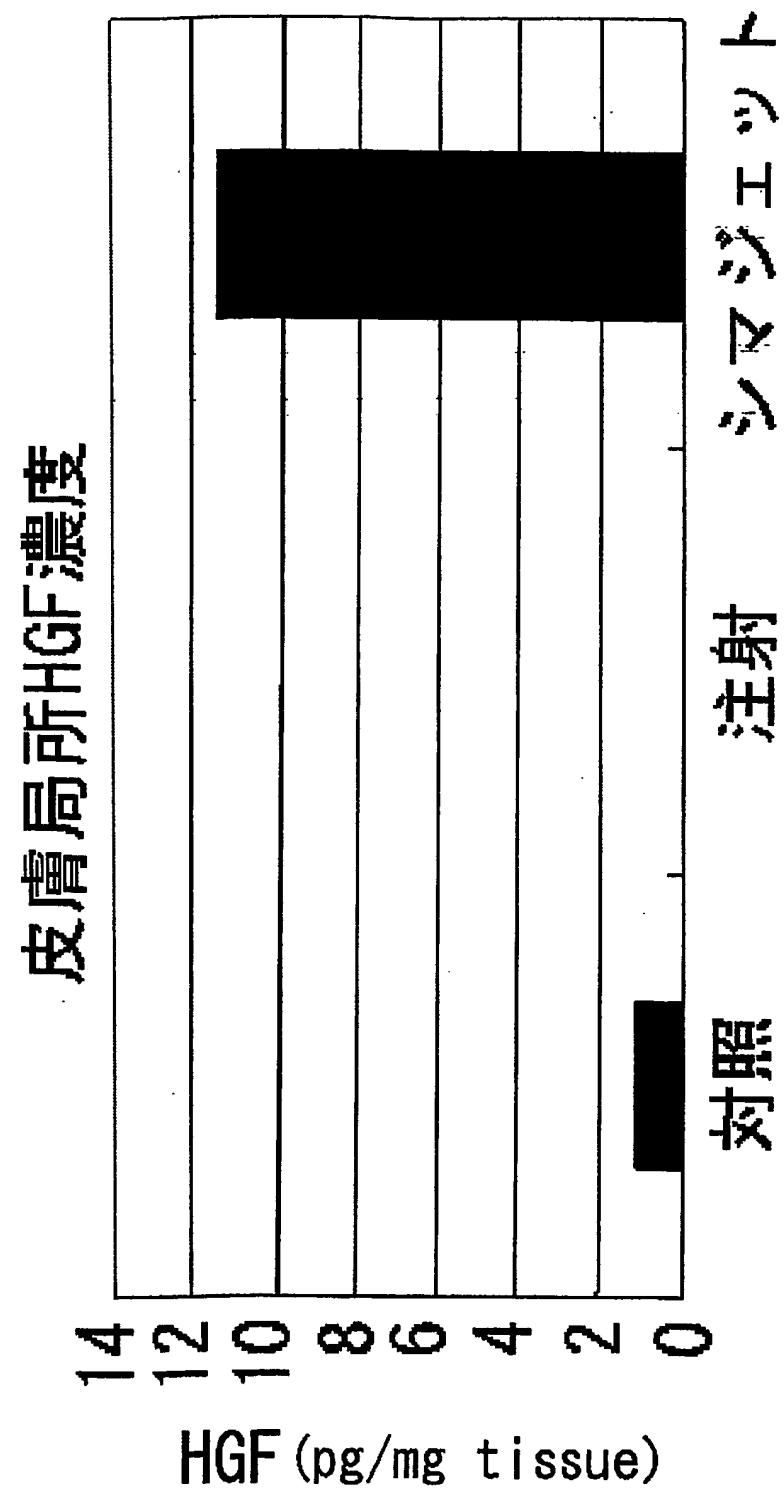
図 6



免疫組織  
化学  
(HGF,  
PGIS)

7 / 7

図 7



10/570052

1 / 2 1AP20 REGD. 2005 23 FEB 2006

## SEQUENCE LISTING

<110> ANGES MG, INC.

<120> Gene\_therapy for skin diseases using a needleless injector

<130> MED-A0402P

<150> JP 2003-307713

<151> 2003-08-29

<160> 2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence Synthetic DNA

<400> 1

ccttgaaggg atttccctcc

20

2 / 2

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence Synthetic DNA

<400> 2

ttgccgtacc tgacttagcc

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012777

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 38/16, 31/7088, 9/08, A61P17/00, 17/02, 17/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 38/16, 31/7088, 9/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/089854 A1 (AnGes MG, Inc.), 14 November, 2002 (14.11.02), Full text; particularly, Claims & EP 1391214 A1 & AU 2002255332 A	16-45
Y	WO 2002/000258 A1 (Medgene Bioscience, Inc.), 03 January, 2002 (03.01.02), Full text; particularly, Claims & EP 1300158 A1 & US 2003/0171287 A1 & AU 200166338 A & KR 2003014391 A & CN 1446105 A	16-45

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 November, 2004 (25.11.04)Date of mailing of the international search report  
14 December, 2004 (14.12.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012777

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/066070 A1 (AnGes MG, Inc.), 29 September, 2002 (29.09.02), Full text; particularly, Claims & EP 1362600 A1 & US 2004/0162251 A1 & AU 2002230166 A1	16-45
Y	JP 2001-500858 A (POWDERJECT RESEARCH LTD.), 23 January, 2001 (23.01.01), Full text; particularly, Claims & WO 98/03196 A1 & EP 918540 A1 & US 2002/0137716 A1 & FR 2751228 A & AU 9737732 A	16-45
Y	WO 99/31262 A2 (GENEMEDICINE, INC.), 24 June, 1999 (24.06.99), Full text; particularly, Claims & JP 2003-528024 A & EP 1038016 A2 & AU 9919229 A	16-45
Y	JP 2002-542264 A (POWDERJECT VACCINES, INC.), 10 December, 2002 (10.12.02), Full text; particularly, Claims & WO 2000/063385 A2 & EP 1180150 A2 & AU 200044797 A	16-45

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/JP2004/012777**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 1-15  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1 to 15 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A61K48/00, 38/16, 31/7088, 9/08, A61P17/00, 17/02, 17/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A61K48/00, 38/16, 31/7088, 9/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2002/089854 A1 (アンジェス エムジー株式会社) 2002.11.14 全文、特に特許請求の範囲 &EP 1391214 A1 &AU 2002255332 A	16-45

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.11.2004

国際調査報告の発送日

14.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

4 P 9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	WO 2002/000258 A1 (メドジーン バイオサイエンス株式会社) 2002. 01. 03 全文、特に特許請求の範囲 &EP 1300158 A1 &US 2003/0171287 A1 &AU 200166338 A &KR 2003014391 A &CN 1446105 A	16-45
Y	WO 2002/066070 A1 (アンジェス エムジー株式会社) 2002. 09. 29 全文、特に特許請求の範囲 &EP 1362600 A1 &US 2004/0162251 A1 &AU 2002230166 A1	16-45
Y	JP 2001-500858 A (パウダージェクト リサーチ リミテッド) 2001. 01. 23 全文、特に特許請求の範囲 &WO 98/03196 A1 &EP 918540 A1 &US 2002/0137716 A1 &FR 2751228 A &AU 9737732 A	16-45
Y	WO 99/31262 A2 (GENEMEDICINE, INC.) 1999. 06. 24 全文、特に特許請求の範囲 &JP 2003-528024 A &EP 1038016 A2 &AU 9919229 A	16-45
Y	JP 2002-542264 A (パウダージェクト ヴァクシンズ, インコーポレイテッド) 2002. 12. 10 全文、特に特許請求の範囲 &WO 2000/063385 A2 &EP 1180150 A2 &AU 200044797 A	16-45

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 1-15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 1-15 は手術又は治療による人体の処置方法であり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の單一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**